

# ポリオーマウイルス転写，複製系を用いた p53 の機能解析

著者	神田 輝
号	1261
発行年	1995
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21100">http://hdl.handle.net/10097/21100</a>

氏 名（本籍）	かん 神	だ 田	てる 輝
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 6 1 号		
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻		
学 位 論 文 題 目	Functional analysis of p53 with polyomavirus transcription and replication systems. （ポリオーマウイルス転写，複製系を用いた p53 の機能解析）		
	（主 査）		
論 文 審 査 委 員	教授 森	昌 造	教授 堀 井 明
	教授 菅 村 和 夫		

# 論文内容要旨

## 研究目的

p53 遺伝子はヒト癌において最も高率に変異が同定されている癌抑制遺伝子である。p53 蛋白（以下 p53）は転写因子として機能することが報告されているが、細胞増殖と密接な関係にある DNA 複製を直接制御している可能性も指摘されている。本研究では p53 の DNA 複製制御活性を検討し、p53 の複製制御に関わる機能ドメインを同定することを目的とした。

## 研究方法

本研究では、ポリオーマウイルス DNA を用いて転写制御、複製制御の両面から解析を行った。ポリオーマウイルスは、エンハンサー配列が DNA 複製に必須であることから、転写因子と DNA 複製の関係を調べる格好の材料となっている。

p53 の DNA 結合活性を調べるため p53 の結合配列をプローブとしてゲルシフト解析を行った。次にポリオーマウイルス DNA の複製開始領域の後期遺伝子側に存在するエンハンサー配列のかわりに p53 の結合配列あるいはその変異配列を挿入したリポータープラスミドを作製した。初期プロモーターの下流に CAT 遺伝子をつなぐことで、同一のプラスミドを用いて転写と複製の両者に対する影響を調べた。

## 研究結果

### 1) p53 の DNA 結合活性の検討

正常 p53 を高発現している F9 細胞の細胞抽出液を放射線ラベルした p53 結合配列と混合して電気泳動すると p53 が結合したことを示すシフトバンドがみられた。それに対して p53 の発現のない (10)1 細胞の細胞抽出液ではシフトバンドがみられなかった。野生型 p53、および点変異を有する 2 種類の変異型 p53 を発現するベクターを (10)1 細胞にトランスフェクションして細胞抽出液を取り、同様の実験を行うと、野生型 p53 のみシフトバンドが生じ、変異型ではバンドはみられなかった。これより野生型 p53 のみ DNA 結合能を持ち、変異型はそれを失っていることを確認した。

### 2) p53 の転写活性の検討

p53 の発現のない (10)1 細胞に野生型及び変異型の p53 発現ベクターとリポータープラスミドをコトランスフェクションし、CAT アッセイを行い転写活性化能を検討した。野生型 p53 のみ初期プロモーターからの転写を活性化し、変異型は転写活性化を示さなかった。p53 結合配列に

変異を導入したレポーターでは、p53 の転写活性は消失した。

### 3) p53 の複製活性化能の検討

(10)1 細胞にレポーター遺伝子、p53 発現ベクター、およびポリオーマ大型 T 細胞発現ベクターをコトランスフェクションして、Dpn I アッセイを用いて、リポータープラスミドの複製を観察した。野生型 p53 のみリポータープラスミドの複製を約 10 倍活性化した。変異型 p53 はいずれも複製を活性化しなかった。p53 の認識配列に変異を持ったレポーターの複製は逆に抑制されたが、この現象は野生型 p53 により大型 T 抗原発現ベクターのプロモーター活性が強く抑制された結果、複製に必須である大型 T 抗原の発現量が減少していたためと推定された。この結果より、p53 による複製の活性化が結合配列特異的に起きていることがわかった。以上より変異型 p53 は、野生型 p53 のもつ DNA 結合能、転写活性化能、DNA 複製活性化能をいずれも失っていることが示された。

### 4) p53 の複製活性化ドメインの同定

野生型 p53 の欠失変異体を用いて、転写及び複製活性化を担うドメインの同定を試みた。転写活性化ドメインは報告されている通り N 末端側の 60 アミノ酸内に存在した。N 末端側の転写活性化ドメインを欠失した変異体は、転写活性化能を完全に失っているにもかかわらず、野生型の約 1/2 の複製活性化能を保持していた。このことから転写活性化ドメイン以外の領域に複製活性化能が存在することが示唆されたため、さらに C 末端側の欠失変異体を作製した。C 末端側の 60 アミノ酸を欠失することにより複製活性化能は約 1/5 に著明に減少した。ゲルシフト解析により、p53 蛋白の中央の領域だけで DNA に結合することを確認した。N、C の両端を失った変異体は DNA 結合能を有するにもかかわらず、野生型の約 1/10 の複製活性化能しか示さなかった。以上より p53 の N、C の両末端が複製活性化にとって重要であることが示された。

## 考 察

p53 の機能に関しては、転写因子としての解析は進んでいるが、複製制御因子としての解析は十分ではない。本研究は、ポリオーマウイルス DNA 複製系を用いて、P53 の複製制御因子としての可能性を示したもので、p53 の多機能蛋白としての性格が明確にされたといえる。さらに転写活性化と複製活性化は異なる領域によって担われていることを示した。本研究で同定された複製活性化ドメインとほぼ同じ領域に細胞性複製蛋白質が相互作用することが報告されており、転写因子による複製制御のメカニズムを考える上でも、本研究は意義深いと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

p53 遺伝子蛋白（以下 p53）は転写因子として機能することが報告されているが、細胞増殖と関連する DNA 複製を制御している可能性も指摘されている。本研究では p53 の DNA 複製制御活性を検討し、複製制御に関わる機能ドメインを同定することを目的とした。

方法として、polyomavirus DNA を用いて転写・複製制御の解析を行った。また、DNA 結合活性を調べるため p53 の結合配列をプローブとしてゲルシフト解析を行った。次に、polyomavirus DNA 複製開始領域の後期遺伝子側のエンハンサー配列に替えて p53 の結合配列または変異配列を挿入したりポータープラスミドを作製した。さらに初期プロモーター下流に CAT 遺伝子をつなぎ、転写と複製に対する影響を調べた。

その結果、1) p53 の DNA 結合活性の検討により、野生型 p53 のみが DNA 結合能を持ち、変異型はそれを失っていることを確認した。2) p53 の転写活性化能の検討の結果、野生型 p53 のみ初期プロモーターからの転写を活性化した。p53 結合配列に変異を導入したレポーターでは p53 の転写活性は消失した。3) p53 の複製活性化能の検討では、野生型 p53 のみポータープラスミドの複製を約 10 倍活性化したが、変異型は活性化しなかった。p53 の認識配列に変異を持つレポーターの複製は抑制されたが、この現象は野生型 p53 により大型 T 抗原発現ベクターのプロモーター活性が抑制された結果、大型 T 抗原の発現量が減少したためと推定された。この結果、p53 による複製の活性化が結合配列特異的に起きることが明らかとなった。以上より、変異型 p53 は野生型 p53 のもつ DNA 結合能、転写活性化能、DNA 複製活性化能を失っていることが示された。4) p53 の複製活性化ドメインの同定により転写活性化ドメインは N 末端側の 60 アミノ酸内に存在することが判明した。N 末端の転写活性化ドメインを欠失した変異体は転写活性化能を失っているにもかかわらず、野生型の 1/2 の複製活性化能を保持していた。このことから転写活性化ドメイン以外の領域に複製活性化能の存在が示唆されたため、さらに C 末端側の欠失変異体を作製した。C 末端の 60 アミノ酸の欠失により複製活性化能は約 1/5 に減少した。N、C 両端を失った変異体は DNA 結合能を有するにもかかわらず、野生型の 1/10 の複製活性化能しか示さず、p53 の N、C 両末端が複製活性化に重要であることが示された。

本研究は polyomavirus DNA 複製系を用いて p53 の複製制御因子としての可能性を示したもので、p53 の多機能蛋白としての性格が明確にされた。さらに転写活性化と複製活性化は異なる領域によって担われていることを示した。ここで同定された複製活性化ドメインとはほぼ同じ領域に細胞性複製蛋白質が相互作用することが報告されており、本研究は転写因子による複製制御のメカニズムを考える上でも意義深く、学位論文として値する。